云 南 植 物 研 究 1992；14 (2)：187—192
Acta Botanica Yunnanica

香菇原生质体诱变及营养缺陷型突变体筛选*

杨崇林　　张鉴铭

（中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204）

摘要　从香菇（*Lentinus edodes*）单核菌丝分离出的原生质体铺于含 0.6 mol／l 蔗糖的 CM 表面，经紫外线照射 30 秒后，生长出的菌落被转移到 MM 之上。在 MM 上生长停止或生长缓慢的菌落经进一步检测，得到 7 个营养缺陷型突变体。经斜面 CM 上 3 次转代培养及原生质体分离和再生，表明有 3 个突变体仍保持稳定；可用作细胞融合研究，但其原生质体产量尚需进一步提高。

关键词　香菇　原生质体　营养缺陷型突变体

INDUCTION AND SELECTION OF AUXOTROPHIC MUTANTS FROM THE PROTOPLASTS OF LENTINUS EDODES

YANG Chong-Lin，ZHANG Jian-Ming

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica,* Kunming 650204)

Abstract　Protoplasts isolated from monokaryotic mycelia of *Lentinus edodes* were spread on CM containing 0.6 mol／l sucrose and irradiated for 30 seconds. After colonies formed, they were transplanted on MM and those showing little growth were detected further. 7 auxotrophic mutants were obtained at last, among which 3 mutants remained stable after protoplast isolation, regeneration and mycelial subculture on CM slant for 3 times. They can be used in protoplast fusion in later studies, despite their protoplast yields were low and have to be improved.

Key words　*Lentinus edodes*；Protoplast；Auxotrophic mutant

在食用菌细胞融合的研究中，营养缺陷型突变体常被用作融合亲本以便检出融合子。常规的诱变方法多为使用射线处理孢子、菌丝碎片等。用原生质体作为处理材料以获得突变体的方法，是颇为有效的技术，因为它能避免在处理具有细胞壁的孢子和菌丝碎片时存在的许多不利因素。利用此种途径已在侧耳属（*Pleurotus*）[1, 2, 3] 的一些种类中获得了营养缺陷型突变体。对香菇（*Lentinus edodes* (Berk.) Singer）的此类研究，国外已有少量报道[4]，而国内尚无此例。为了使原生质体融合技术应用于香菇遗传育

1991年3月收稿，同年5月定稿。

* 国家自然科学基金及云南省应用基础基金资助项目。

种，本试验利用紫外线处理从香菇单核菌丝分离的原生质体，经一系列筛选得到了7个营养缺陷型突变体，并对它们的一些特性进行了研究。

材料和方法

1. 实验材料

149–11为从香菇（*Lentinus edodes*）品种149中分离得到的单核系，149是较适合昆明地区栽培的优质高产品种。

S_g–9为从市售香菇（*Lentinus edodes*）中分离得到的单核系，S_g的栽培性状类似于香菇品种7402。

2. 培养基

完全培养基（CM complete medium）为马铃薯综合培养基。基本培养基（MM minimal medium）参考Tetsuo toyomasu等的基本培养基[2]，其中$(NH_4)_2HPO_4$改为$NH_4H_2PO_4$。

按以上成分制成液体或固体培养基，后者为液体培养基中加入0.6%的琼脂粉制成。

3. 酶溶液

脱壁酶溶液同张鉴铭等在分离尖顶羊肚菌原生质体时采用的2号酶液[5]。

4. 原生质体分离和纯化

单核菌丝体在液体CM中静置培养4–5天，取出用无菌水漂洗后，用滤纸吸去表面水分，在每毫升酶液中放入100毫克左右于30℃下静置酶解4—5小时，用血球计数器计数原生质体。尔后用孔径为40—80 μm的砂芯漏斗滤除残余菌丝，滤液1 500—2 000转／分钟离心去酶液，得较为纯净的原生质体。

5. 诱变处理及原生质体培养

在直径为6 cm的培养皿中倒入5—6 ml含0.6 mol／l蔗糖的固体CM制成平板，将经计数后的原生质体铺于其上，在20W紫外灯下距离13 cm照射15、30、45秒。经处理后的原生质体在黑暗中静置30分钟以上后，再于其上铺一层薄的含0.6 mol／l蔗糖的固体CM，在25℃下保湿培养。

6. 营养缺陷型突变体的筛选

经7—10天，培养在固体CM上的原生质体可生长出菌落。将这些菌落转于平面MM之上，10天左右后弃去表现生长的菌落，再将余者转于平面CM之上使之增大到一定程度（菌落直径2 cm左右）后，分别在添加水解酪蛋白（casein–hydrolysate, 1%）. DNA+RNA（100μg／ml）和维生素类（100μg／ml）的MM上检测使其缺陷类型分开；然后于各类生长谱上检测，其中氨基酸生长谱如表1，核苷酸生长谱为：A. MM+腺嘌呤（Adenine）；B. MM+DNA；C. MM+RNA；D. MM+DNA+RNA.

以上各种添加物的浓度均为100μg／l。最后根据上面检测的结果，在含单一物质的MM上确证突变体。

7. 突变体的转代培养及原生质体分离和再生

突变体菌落分别于斜面CM上转代3次，转代前后分别在平面CM上测其生长速度。突变体的原生质体分离和纯化方法同前。原生质体铺于培养基表面，25℃下保湿培养。

表 1.　用以检测菌落缺陷型的氨基酸生长谱

Table 1.　Combinations of amino acids to detect the auxotrophic type of colonies (100μg / ml)

№	Amino acids					
1	Gly	Tyr	Val	Lys	Met	Arg
2	Ala	Tyr	Cys	Asp	Glu	His
3	Thr	Val	Cys	Pro	Pro-OH	Ser
4	Leu	Lys	Asp	Pro	Trp	Gln
5	Ile	Met	Glu	Pro-OH	Trp	Asn
6	Phe	Arg	His	Ser	Gln	Asn

结果和讨论

1. 7 个营养缺陷型突变体的选出

原生质体经紫外线处理 30 秒，致死率可达 80%。在此条件下，149-11 和 S_g-9 的原生质体在 CM 上生长出菌落后，分别有 1002 和 614 个菌落被转移到 MM 上，表现出生长停止或生长缓慢的菌落各在 39 和 16 个。其中，149-11 有 12 个菌落能在含水解酪蛋白的 MM 上生长，经氨基酸生长谱检测，最后得到 4 个氨基酸类缺陷型突变体，但它们在该生长谱的 6 组氨基酸上均不能生长，表明其需要多种氨基酸；有两个菌落能在含 DNA 和 RNA 的 MM 上生长，经核苷酸生长谱检测得到一个腺嘌呤缺陷型突变体和一个只能在含 RNA 的 MM 上生长的突变体。S_g-9 有一个菌落能在含水解酪蛋白的 MM 上生长，氨基酸生长谱检测时该菌落在第一组和第四组上表现生长，故为赖氨酸缺陷型。在实验中未发现维生素类缺陷型突变体。所有突变体及其营养需要如表 2；它们在 CM、MM 及添加其各自营养需要物的 MM 上的生长状况如图 1：3—9。

2. 突变体菌落的转代与稳定性

转代前后突变体菌落在平面培养基上的生长速度及生长状况如表 2。

表 2.　突变体菌落的生长速度

Table 2.　The growth speed of mutant colonies　(cm / 10 days)

Colony	Nutritional requirement	Generation 1			Generation 4		
		CM	MM	MM+NR	CM	MM	MM+NR
149-11	wild	2.8	2.8				
S_g-9	wild	3.2	2.7				
149-11-2	RNA	2.7		1.5	2.9		2.6
149-11-20	Chl	2.3		1.6	2.0	0.8	3.1
149-11-23	Chl	1.4		1.8	1.4	0.8	2.0
149-11-28	Ade	2.8		2.7	2.8		3.1
149-11-30	Chl	1.2		0.4	1.6	1.0	2.0
149-11-39	Chl	1.8		1.5	2.5		1.5
S_g-9-6	Lys	2.6		1.0	2.9		1.2

Note: NR nutritional requirement, RNA chemical reagent Chl casein-dydrolysate

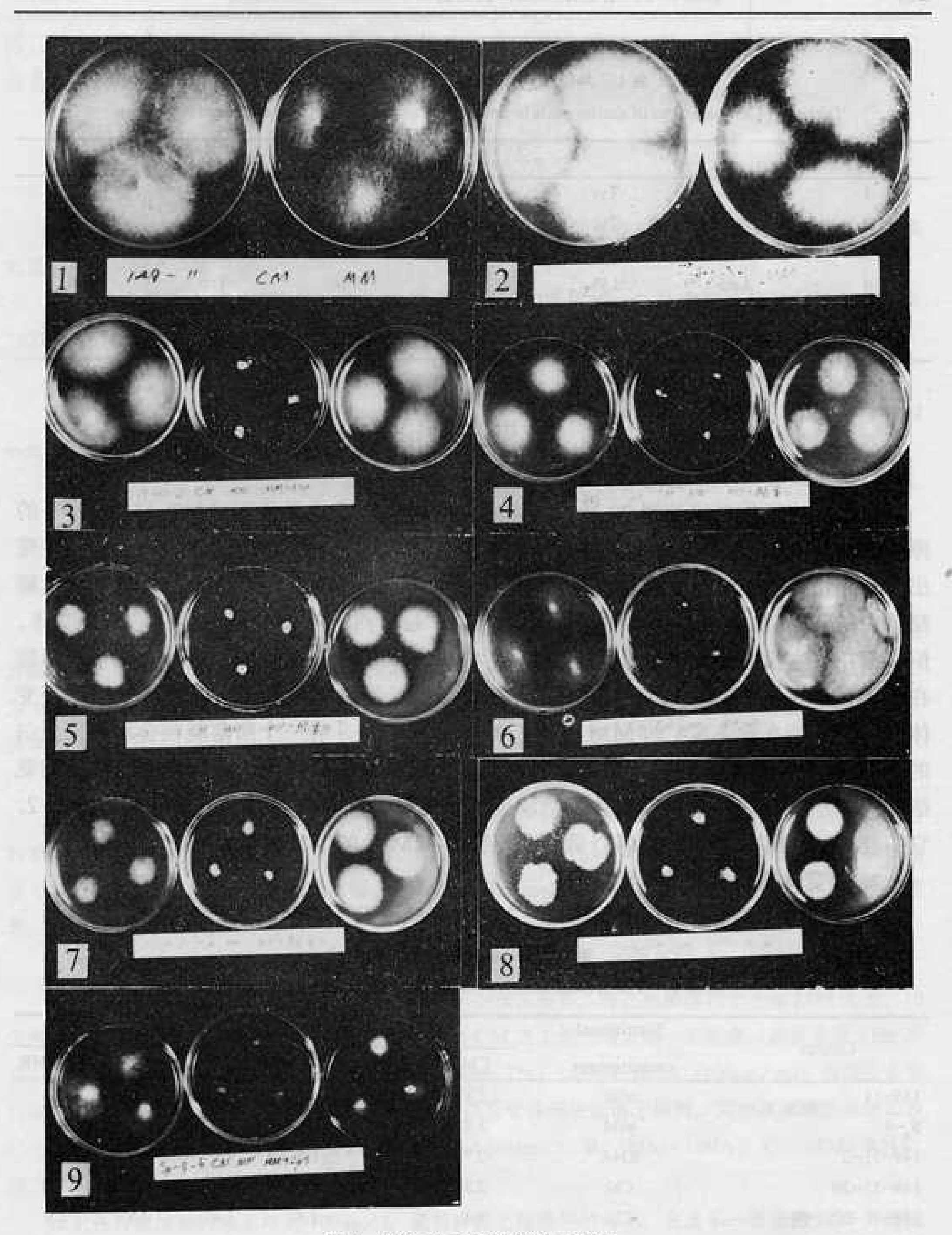


图1. 培养10天后菌落的生长状况

1—2. 分别为149-11、S_g-9在CM（左）及MM（右）上的生长状况；3—9.（从左至右）分别为149-11-2、149-11-20、149-11-23、149-11-28、149-11-30、149-11-39及S_g-9-6在CM（左）、MM（中）、M+NR（右）上生长状况.

Fig.1 Colonies growing on medium for 10 days

1—2. show 149-11 & S_g-9 growing on CM (left in each picture) and MM (right in each picture); 3—9. (from left

to right) show 149–11–2, 149–11–20, 149–11–23, 149–11–28, 149–11–30, 149–11–39 and S_g–9–6 growing on CM (left in each picture), MM (middle in each picture) and MM+NR (right in each picture).

表 2 显示出，突变体菌落的生长速度与亲本菌落的生长速度之间存在着一定的差异。转接 3 代后的突变体。在 CM 上基本保持了与第一代相似的生长速度，而在添加其营养需要物的 MM 上，转接后多数菌落的生长速度要高于转接前。149–11–20、149–11–23 和 149–11–30 经转代后在 MM 上有一定程度的生长，实验中观察到这种生长较弱，菌丝稀疏，黄褐色；然而在加入其营养需要物的 MM 上，菌丝生长十分茂密健壮，表现为白色。这一现象表明，在转代过程中，这些菌落发生了一定程度的回复突变，使其能部份合成所缺失物质，但不能满足菌丝正常生长的需要。转代试验表明，有 4 个突变体通过此途径仍然保持稳定，经转代后在 MM 上仍未见菌丝生长。

3. 突变体原生质体的分离和再生

在液体 CM 中静置培养的菌丝体，年龄在 4—5 天时较宜用作分离原生质。多数突变体的原生体产量与亲本有较大差异（如表 3），除 149–11 外，余者均低于亲本的原生质体产量。

突变体的原生质体在含 0.6 mol／l 蔗糖的固体 CM 上培养 7 天左右，即可形成肉眼可见菌落。在含 0.6 mol／l 蔗糖的 MM 上，一般要晚 2—3 天。

表 3.　营养缺陷型突变体的原生质体产量和再生率

Table 3.　Protoplast yields and regeneration frequencies of auxotrophic mutants

Organism	Protoplast yield ($\times 10^5$ / ml solution)	Regeneration frequency (%)	
		CM	MM
140–11	11	2.4	0.9
S_g–9	3.6	1.8	0.4
149–11–2	1.5	—	—
149–11–20	13	1.9	1.6
149–11–23	2.5	0.06	—
149–11–28	3.6	1.4	—
149–11–30	2.0	—	—
149–11–39	4.3	2.6	1.8
S_g–9–6	3.6	0.4	0.02

Note: "—" no colony formed on regeneration medium contains 0.6 mol / l sucrose

在 7 个突变体中，除 149–11–20 和 149–11–39 外，在 MM 上没有菌落形成或仅有极低的再生率。前两者的原生质体在两种培养基上均表现出较高的再生率，尤其在 MM 上的再生率较亲本要高得多，根据此两个突变体在斜面 CM 上转代前后在 MM 上的生长状况推测，这种现象出现的可能性之一就是原生质体的分离再生过程使原来的突变发生了某种程度的回复，甚至在原生质体再生能力方面出现了新的变异。

本试验结果表明，用紫外线处理香菇单核菌丝的原生质体，能有效地获得突变体。所获得的 7 个营养缺陷形突变体经转代培养及原生质体分离和再生两种途径检测其稳定

性后，发现有3个突变体是稳定的，可用作细胞融合时的融合亲本。它们是：149-11-2、149-11-28及S_g-9-6，但其原生质体产量较低（如表3）。如何提高其原生质体产量以用于细胞融合研究，仍有待于进一步探索。

致谢 香菇菌种149由昆明市科委食用菌开发中心高级农艺师刘学系先生惠赠。

参考文献

〔1〕Lee Jae-Sung, Yoshihiko Iijima, Hideyuki Kobayashi, et al. Release, regeneration and mutant induction of *Pleurotus cornucopiae*("Tamogitake") protoplasts. *Agric Biol Chem* 1988; **52** (7): 1877—1878

〔2〕Tetsuo Toyomasu, Takuo Matsumoto, Kan-ichi Mori. Interspecific protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneo-stramineus*. *Agric Biol Chem* 1986; **50** (1): 223—225

〔3〕Tetsuo Toyomasu, Kan-ichi Mori. Intra-and interspecific protoplast fusion between some *Pleurotus* species. *Agric Biol Chem* 1987; **51** (3): 935—937

〔4〕Toshiyuki Kawasumi, Takahiko Baba, Sonoe O.Yangagi. Protoplast fusion of incompatible mating type combinations of *Lentinus edodes* (Shiitake) auxotrophs. *Agric Biol Chem* 1988; **52** (12): 3197—3199

〔5〕张鉴铭，郑玉萍，陈梅英等. 尖顶羊肚菌原生质体的分离及再生. 云南植物研究 1989; **11** (4): 449—452